

活化淋巴细胞特异性的检测方法

技术领域

- 5 本发明涉及器官移植后，或机体受病毒、细菌感染或接种疫苗后，检测体内活化淋巴细胞的特异性的方法。

背景技术

- 10 免疫(immune)或免疫性(immunity)是生物识别和清除抗原性异物的一种生理性反应。引起免疫的抗原物质大多不是生物体自身的，而是外源性物质，它们进入生物体后能被机体的免疫系统迅速识别，并通过一系列免疫应答过程予以消灭，使机体恢复原来的平衡状态。

- 在进行器官移植时，供受体间的抗原性差异如主要组织相容性抗原(major histocompatibility antigen MHC)和次要组织相容性抗原(mH-antigen)的不同，就可刺激
- 15 受体产生针对供体器官存在的与受体不同的抗原的特异性活化淋巴细胞，这些特异性活化淋巴细胞就会攻击供体器官产生排斥反应。当机体受病原微生物感染，如麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型及庚型肝炎病毒、水痘和带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、冠状病毒、轮状病毒、柯萨基病毒、埃可病毒(ECHO)、埃博拉病毒、黄热病毒、腺病毒、森林脑
- 20 炎病毒、风疹病毒、登革热病毒、流行性乙型脑炎病毒、狂犬病毒、SARS 病毒、流行性感冒病毒(包括人、禽)流行性腮腺炎病毒、出血热病毒、艾滋病毒、脊髓灰质炎病毒、立克次体、流行性脑炎双球菌、伤寒或副伤寒杆菌、结核杆菌、白喉杆菌、百日咳杆菌、炭疽杆菌、布氏杆菌、鼠疫耶尔森菌、麻疯杆菌、非典型分枝杆菌、钩端螺旋体、梅毒螺旋体、回归热螺旋体、衣原体、支原体、隐孢子虫、利什曼原虫、弓
- 25 形虫、日本血吸虫、并殖吸虫、华支睾吸虫、姜片虫、丝虫、等感染时同样会刺激机体产生分别针对各种病原微生物的特异性活化淋巴细胞；在同一个机体中可能同时存在多种特异性的、分别针对多种不同抗原的活化淋巴细胞，如一个心脏移植后出现排斥反应的患者感染了疱疹病毒，那么在该患者体内，既有特异性针对供体器官主要组织相容性或次要组织相容性抗原的活化淋巴细胞，又有特异性针对疱疹病毒的活化淋
- 30 巴细胞存在。

器官移植是治疗许多器官终末期疾病的唯一方法。在器官移植后,供受体间 MHC 和 mH 抗原的差异将引起排斥反应,排斥反应仍是目前影响心、肝、肾、骨髓等器官或细胞移植后,3 年、5 年、10 年存活率的主要因素,而排斥反应的发生首先开始于淋巴细胞的活化。如果受者体内出现抗供体特异性活化淋巴细胞,则预示着机体启动了攻击供体器官的反应,提示人们尽早采取针对性的措施,如增加免疫抑制剂剂量或更换免疫抑制剂种类等,从而使供体器官在受体体内保持一个良好的功能状态,进而提高移植受者的生存质量和生存期限。

目前活检穿刺仍是世界上各移植中心诊断排斥反应的根本方法和唯一标准,但由于活检穿刺本身具有一定的危险性,不宜多做,而且费用昂贵,病人比较痛苦,不易为医生和病人所接受。而且一个移植器官如心、肝、肾等,即使发生排斥反应,其病变也不是均一的,而是有的部位有、有的部位无,有的轻、有的重。活检穿刺只能从器官的局部取材,容易误诊;另外活检病理观察,主要是看病理学改变,一旦出现病理学改变,也就表明器官已经受到了损害;为建立一个方便、快速、敏感的非侵入性的器官移植排斥反应诊断方法,国内外研究者做了大量工作,尝试了很多方法和标志物,结果均不理想。所以,提供一个方便、快速、准确、敏感的排斥反应非侵入性诊断方法,对提高移植患者的生存质量和延长移植器官的使用期限,具有重要意义;而且排斥反应的发生首先开始于淋巴细胞的活化,活化淋巴细胞的出现应早于病理改变。本发明主要是通过检测外周血中被 MHC 或 mH 抗原活化的特异性淋巴细胞来诊断排斥反应,所以本方法对排斥反应的诊断应早于移植器官的病理改变。另外,本方法简便易行,可自动操作,易标准化,克服了上述活检穿刺方法的缺陷,能对诊断排斥反应提供快速、准确、清楚的测试结果。所以该方法的应用对指导临床调整免疫抑制剂用量,延长移植物存活期限,提高移植患者生存质量,将会有极为重要的意义。

在病原微生物感染方面,如乙脑病毒、麻疹病毒、水痘病毒、结核杆菌等许多感染性疾病均有一个潜伏期,在这期间及发病早期大多只表现为非特异症状如发热等,无特异性表现,而这些疾病的诊断常常依赖于该病典型临床症状(特异性表现)的出现,但典型症状出现一般较晚;有些甚至一直没有典型症状,常导致误诊,延误病情,引起严重后果。

本发明应用在病原微生物感染诊断方面,可提供一个能在潜伏期或发病早期快速准确进行确诊的方法,对各种传染病早发现、早隔离、早治疗,避免传染和流行,也将具有重要意义。

发明内容

本发明涉及一种检测机体活化淋巴细胞特异性的方法，其包括：1) 用培养基稀释检测用抗原，所述抗原能使机体的淋巴细胞活化；所述培养基除包含常规细胞培养所需成分外，还添加了对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体和 / 或对单个核细胞具有诱导凋亡或抑制活化或抑制增殖作用的细胞因子；

2) 用所述培养基制备包含待检活化淋巴细胞的单个核细胞悬液；

3) 将所述检测用抗原、含待检活化淋巴细胞的单个核细胞加入细胞培养板中一起培养；

4) 通过比较试验孔与阴性对照孔的可检测信号的差异，来确定检测样品中是否存在抗原特异的活化淋巴细胞。

本发明的方法适用于任何抗原刺激机体所产生的活化淋巴细胞的特异性检测。

本发明所使用的抗原为同种异体抗原，异种抗原或各种病原微生物的抗原。同种异体抗原或异种抗原样品可以是一种抗原也可以是来自一个个体或多个个体的混合抗原，其存在形式可以是以颗粒抗原的形式存在于人或动物细胞膜上或存在于霉菌、细菌的细胞膜或细胞壁上或存在于病毒包膜或衣壳上。也可以是以可溶性抗原的形式溶解在溶液中。

同种异体抗原是等位基因的直接或间接产物，该等位基因的产物可作为抗原被同一物种的另一成员所识别。该等位基因的产物不但有多肽，而且还有特异多糖和由等位基因编码的酶合成的脂类。本发明中所用的同种异体抗原属组织相容性抗原，包括主要组织相容性抗原(MHC)(在人类称为“HLA”，猪称为“SLA”，猴称为“MAMU”，黄狒狒为“PACY”，小鼠的为 H₂ 抗原，大鼠的为 RT₁ 抗原等)和次要组织相容性抗原(mH-antigen)两组。

异种抗原是指两物种间一物种具有而另一物种所不具有的、能被另一物种识别产生免疫应答的物质，如多肽、特异性多糖，脂类等。如将猪器官对人、猴、狒狒、黑猩猩等移植时，猪体内所具有而人、猴、狒狒、黑猩猩等体内所不具有的上述物质即为异种抗原。

病原微生物抗原可以是一种细菌或病毒的某一个特异性抗原，也可以是这种细菌或病毒的混合抗原(每一种细菌或病毒都表达许多种抗原)，其存在形式可以是经非离子去垢剂、脂溶剂或 10% 甲醛处理的细菌或病毒颗粒，也可以把细菌或病毒抗原表达

在人或动物细胞株的细胞膜上，还可以是以可溶性抗原的形式溶解于溶液中。

本发明中的目的抗原是指被检测者体内可能含有其特异性活化淋巴细胞的、通过检测希望证实或排除的检测用抗原。

本发明中的无关抗原是指在被检测者体内不可能含有其特异性活化淋巴细胞，在检测中作为阴性对照的抗原。无关抗原根据检测目的不同而不同，可另外添加，也可在一个检测板内相互作为阴性对照抗原。

本发明所使用的抗原可以是颗粒性抗原，如携带某个或某些人类 HLA 抗原的细胞、细菌或病毒，或携带某个病毒或细菌抗原的细胞、细菌或病毒等；也可以是可溶性抗原，如同种异体或异种抗原分子或某个病毒或细菌的某个特异性蛋白分子。

10 本发明所使用的抗原可以是一种同种异体或异种抗原分子，也可以是多种或人类全部 HLA 及 mH 抗原分子的混合物；是一种病毒或细菌的特异性抗原，也可以是几种病毒或细菌的混合抗原。用单一抗原和混合抗原的区别在于结果提示诊断的精确性不同，如用同种异体抗原的混合抗原做检测，其阳性结果只能提示有同种异体抗原特异性活化的淋巴细胞，即机体已启动了攻击供体器官的排斥反应，而不能确定是哪一个
15 一个抗原诱导了淋巴细胞的活化从而引起了排斥反应；而用各个单一抗原制成包含人类全部 HLA 和 mH 抗原的检测板检测，其结果阳性则可明确告诉我们机体中的活化淋巴细胞是由哪一个或哪几个同种异体抗原诱导活化的；对于病毒或细菌感染性疾病的诊断也是一样，如用呼吸道合胞病毒、冠状病毒、腺病毒、流感病毒副流感病毒、麻疹病毒、水痘病毒、腮腺炎病毒、疱疹病毒等的混合抗原检测，结果阳性，我们只能
20 说患者被上述病毒中的一些病原体感染了而不能确定已被哪一种病毒感染的，而用单一的某个病毒特异性的蛋白作抗原或相对单一地用某个病毒作抗原则可以确定是哪一种病毒感染。

本发明中所使用的抗原可通过如下方法得到：

1. 选定已配型器官移植受者多人，使这些人外周血 B 细胞膜上的 HLA 抗原组合包含人类全部的 HLA-I 类和 II 类抗原及其 mH 抗原，每个人的这些 HLA 抗原组合
25 是天然形成的，我们只需根据我们的需要挑选某些组合来使用即可。然后取这些人的外周血 0.5ml 放入含适量细胞培养基(如含 10% 新生牛或胎牛血清(GIBCO 公司)的 1640 培养基(GIBCO 公司)或 DMEM(GIBCO 公司)或 Eagle (GIBCO 公司)培养基)的细胞培养瓶中，同时在各培养瓶中加入适量 B958 细胞株(ATCC 公司有售)的细胞培养上清(该细胞株在培养过程中能产生 EB 病毒释放入培养液中)，其量以其所含 EB 病毒足
30

以转化移植受者 0.5ml 外周血中的全部 B 细胞为其合适的量(一般每毫升 50 万个 B958 细胞培养三天后的上清约 5-10ml 即可),然后把细胞培养瓶放 37℃ CO₂ 孵箱中培养 15 天左右,每隔 5 天加培养液 5-10ml,其培养时间长短以观察到培养瓶中出现呈团状悬浮生长的瘤细胞为准。出现团状悬浮生长的瘤细胞后,即可象培养普通细胞一样换液进行常规细胞培养,只是要求所有接触过这些细胞及 B958 细胞的物品及培养上清均要煮沸消毒,以杀灭 EB 病毒——虽然 EB 病毒分布很广,正常人鼻咽腔等部位都可有 EB 病毒存在,但这一步消毒仍是必须的预防措施。以上这些受者的外周血经上述处理就可建立各自的 B 细胞株,把这些细胞株通过克隆化、扩增培养、按常规细胞冻存保种、即可建立他们各自固定表达某几个 HLA 抗原或 / 和 mH 抗原的细胞系。

- 10 2. 含人类 HLA 和 mH 抗原的细胞株还可通过以下基因工程方法得到: 选择不表达人 HLA 或 / 和 mH 抗原的人类细胞株如 U937(ATCC 公司有售)、K562(ATCC 公司有售)等作为抗原载体,通过分子生物学常规技术分别提取上述所选定的受者的外周血白细胞中的 mRNA,通过反转录 PCR 扩增、剪切、拼接等常规基因工程技术构建分别能表达各种 HLA 抗原的表达载体,然后把这些表达载体转入 U937 或 K562 或其它不表达人 HLA 和 mH 抗原的细胞中令其表达,建立分别能表达各种 HLA 抗原的细胞株,即对人类全部 HLA 抗原分别进行表达。其表达载体可以从各种逆转录病毒载体中选择一种使用,也可参考文献 (Immunogenetics 25:1-6,1987) 等,使用文献介绍的方法选择载体和进行抗原表达。对每个 HLA 抗原都各自建立一个表达细胞株,使每个细胞株只表达一种 HLA 抗原,通过建立一百多个细胞株使它们包含人类全部的 HLA 抗原,把这些表达 HLA 抗原的细胞株,分别通过克隆化、细胞培养扩增,常规冻存保种。即可建立分别固定表达某个人类 HLA 或 mH 抗原的细胞系。

3. 含人类 HLA 和 mH 抗原的细胞株还可通过以下方法得到:

- 25 3.1 选择已知表达或不表达人 HLA 或 / 和 mH 抗原的人类细胞株如 Raji(ATCC 公司有售)、U937(ATCC 公司有售)、K562(ATCC 公司有售),或小鼠的腹水瘤细胞系 SP2/0 等作为瘤细胞株;选择某已知 HLA 抗原的人的外周血 B 细胞,参考文献(Abe 等, J Immunol Methods, 90: 111-123),《体外培养的原理与技术》(薛庆善主编,科学出版社出版, 2001 年第一版),《SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY》(Edited by Barbara B. Mishell and Stanley M. Shiigi W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980)和《简明免疫学技术》(朱正美刘辉主编科学出版社出版,2002 年 7 月第一版),添加一些细菌脂多糖(LPS)(SIGMA)(培养液中终浓度为 2-25μg

/ ml)、用 B 细胞生长因子(BCGF)(自制, 见 3.2)、抗人 IgM(Sigma 公司)、美洲商陆(PWM)(Sigma 公司)(培养液中终浓度为 $1-25\mu\text{g} / \text{ml}$)和葡萄球菌 A 蛋白(Sigma 公司)(培养液中终浓度为 $1 / 1000-1 / 10000$)共同培养 2-3 周, 然后参考《单克隆抗体技术》(徐志凯主编, 陕西科学技术出版社出版, 1992 年 1 月第一版), 把 Raji、U937 或 K562 细胞与上述选择的、已经 B 细胞生长因子(BCGF)、抗人 IgM、葡萄球菌 A 蛋白、细菌脂多糖和美洲商陆(PWM)刺激 2-3 周的、已知 HLA 抗原的人的单个核细胞进行融合, 即可得到永生的、固定表达某几个 HLA 抗原的细胞株。通过该方法, 即可得到表达各种不同组合 HLA 抗原的细胞株。从而就可建立各种细胞株, 并使这些细胞株包含人类几乎全部的 HLA 抗原。

10 3. 2 建立 B 细胞株: 参见《体外培养的原理与技术》(薛庆善主编, 科学出版社出版, 2001 年第一版)

1) 淋巴细胞制备: 抽取已知 HLA 抗原的患者的外周血, 肝素(Sigma 公司)抗凝, 用淋巴细胞分离液(Sigma 公司)分离其单个核细胞, 用 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液(GIBCO 公司)配成密度为 $1-10^6$ 个 / ml 的细胞悬液, 放细胞培养瓶中培养 4-8 小时, 晃动细胞培养瓶使细胞悬起, 倒入离心管中 $1000\text{r} / \text{min}$ 离心 10min, 沉淀为纯化的淋巴细胞。

2) 制备含 BCGF 的培养上清液: 用含 1%FCS(GIBCO 公司)的 RPMI 1640 细胞培养液将淋巴细胞配成密度为 2×10^6 个细胞 / ml 的悬液。加 PHA(SIGMA 公司产品)至终浓度 $2\text{pg} / \text{ml}$, 装入培养瓶。置饱和湿度、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 3-4 天。收集培养物于离心管中, 于 4°C 下以 $1500\text{r} / \text{min}$ 离心 10min。收集上清液, 即为粗制 BCGF。于 -20°C 保存。

3)用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液将淋巴细胞配成密度为 1×10^6 个 / ml 的悬液。加入抗人 IgM F(ab)₂ 片段(Sigma 公司)至终浓度为 $20\mu\text{g} / \text{ml}$ 、粗制 BCGF 至终浓度为 10%和细菌脂多糖(LPS)(SIGMA 公司产品、培养液中, 终浓度为 $2-25\mu\text{g} / \text{ml}$)。

25 4)在 24 孔板中, 每孔加细胞悬液 1ml, 置 37°C CO_2 培养箱中培养。每 3-4 天半量换液 1 次, 即先从每孔中吸出 0.5ml 培养上清液弃去, 再加入含 $20\mu\text{g} / \text{ml}$ 抗人 IgM F(ab)₂、10%粗制 BCGF 和培养液中终浓度为 $2-25\mu\text{g} / \text{ml}$ 细菌脂多糖(LPS)的新鲜培养液。培养约 3-5 周, 当生长克隆较大时, 将细胞转移至培养瓶中培养。即为建立的、含已知 HLA 抗原的 B 细胞株。

30 5)通过该方法既可制备表达各种不同 HLA 抗原的 B 细胞株。并使这些细胞株包

含人类几乎全部的 HLA 抗原。

4. 含人类 HLA 抗原及 mH 抗原的细胞株还可通过下列方法得到, 在人群中选择一些不与其它人有相同 HLA 抗原或在十几个 HLA 抗原中与其它人相同 HLA 抗原较少的个体, 提取其外周血, 按方法 1 的方法建立这些个体的 B 细胞株, 然后以这些细胞株为载体, 通过基因工程的方法(如方法 2 的方法), 把这些细胞株上未能包含的一些 HLA 或 mH 抗原也在这些细胞株上表达出来, 从而使用较少的细胞株携带尽可能多的 HLA 抗原, 最后达到用尽量少的细胞株表达出人类全部的 HLA 抗原和 mH 抗原。另外, 按这一思路, 选择表达 HLA-II 类抗原较多的 Raji 细胞株(ATCC 公司有售)或 Dandi 细胞株(ATCC 公司有售)作为抗原载体, 只需建几个细胞株就可使细胞表面包含人类目前发现的全部 18 个 DR 抗原。

5. 把通过上述方法或通过其它方法如直接从人或动物脾脏或外周血得到的表达人类全部 HLA 抗原的细胞或细胞株(培养、扩增后), 混合或分别用无菌双蒸水 37℃ 温育 0.5-2h, 使细胞充分破碎, 然后用低温高速离心机 3000g-20000g 20 分钟离心沉淀细胞膜, 倒掉上清, 把沉淀冻干备用, 使用时用细胞培养基稀释即可得到单一的或混合的 HLA 颗粒抗原, 实际上是脂质体上携带 HLA 抗原, 其稀释浓度视试验要求而定。

6. 本发明所使用的 HLA 抗原除上述的颗粒抗原外还可以是可溶性抗原, 这些抗原可以通过如下方式得到: 方法 2 所构建的 HLA 抗原表达载体可以在培养的人细胞中表达也可以在原核细胞或其它真核细胞(如酵母菌)中表达, 不论以什么方式表达的 HLA 抗原均可经 10% 甲醛固定洗涤后直接作为抗原使用, 也可通过常规亲和层析方法(如用抗 B2 微球蛋白抗体(第四军医大学免疫教研室提供)、抗 HLA 一类抗原或二类抗原单态抗体制备亲和层析柱(第四军医大学免疫教研室提供)或其它蛋白纯化技术进行纯化, 得到 HLA 抗原分子纯品进行下一步试验用。

7. 病原微生物特异性抗原的制备: 各种病原体如麻疹病毒、水痘病毒、结核杆菌等均可参考《体外培养的原理与技术》(薛庆善主编, 科学出版社出版, 2001 年第一版); 《诊断与实验病毒学》(郑州大学出版社出版, 2002 年第一版, 杨占秋、刘建军、肖红、丁晓华主编); 《医用实验病毒学》(杜平主编, 人民军医出版社出版, 1985 年第一版); 参考《现代结核病学》(人民军医出版社, 2000 年第一版, 张敦熔主编)等资料, 按各种微生物各自不同的生长繁殖特点在动物体内或体外培养, 并按它们各自不同的方法使之纯化, 从而得到这些病原体的纯品或相对纯品, 这些相对纯化的病原体经用 ^{60}CO 照射、0.1-10% 甲醛、戊二醛、非离子去垢剂或脂溶剂如乙醚、氯仿处理等方法

使之灭活后即可作为抗原使用。各种病原微生物的特异性抗原还可以是通过基因工程表达的这些病原微生物的特异性抗原，这些抗原可以表达在人类或动物细胞上也可以表达在原核或真核细胞上，这些细胞可以直接作抗原用也可通过亲和层析或其它蛋白纯化技术把这些病原微生物特异性抗原纯化后使用。

5 8. 本发明所使用的抗原还可以是异种抗原，如人类异种移植的合适供体猪(包括各种转基因猪，近交系猪等)的抗原，或小鼠抗原、大鼠抗原、豚鼠抗原等，其抗原也可用上述方法建立它们各自的细胞系，从而作为异种移植时的检测抗原。

9. 本发明的抗原不但可以参考文献自制，也可通过购买得到，如乙脑病毒，麻疹病毒，脊髓灰质炎病毒，白喉杆菌等的抗原均可通过购买这些病原体的疫苗得到。

10 本发明所使用抗原范围较广，所有外来的、能引起机体淋巴细胞特异性活化的物质均可用作本发明的抗原，从而检测机体是否存在被这些抗原特异性活化的淋巴细胞。

通过上述方法或其它方法得到的单一的或混合的抗原，颗粒性抗原或可溶性抗原，同种异体抗原或异种抗原，人类HLA抗原或小鼠、大鼠、猪等动物抗原或细菌、
15 病毒等病原微生物抗原及人类使用的各种疫苗抗原，只要是能引起机体特异性淋巴细胞活化的抗原均可作为检测抗原，用以检测机体内是否存在抗原对应的特异性活化淋巴细胞。

通过上述方法得到的，表达在人类或动物细胞上的抗原或表达在细菌细胞壁或病毒包膜或衣壳上的抗原，需经丝裂霉素或经过0.1-10%甲醛或非离子去垢剂及脂溶剂
20 如丙酮、二甲苯、氯仿等处理灭活后尚可作为检测抗原使用，特殊情况下亦可不经处理直接使用。经亲和层析或其它蛋白质纯化方法得到的较纯的纯化蛋白质抗原(可溶性抗原)及脂质体上吸附的目的抗原可直接作为检测抗原使用。

经无菌操作得到上述各种抗原后，即可把这些抗原分别或混合搭配(根据不同目的进行各种搭配)后，与用常规淋巴细胞分离液分离单个核细胞的方法得到的患者或试
25 验者的外周血单个核细胞一起培养。其稀释单个核细胞及抗原的培养液中，除常规细胞培养时需添加的小牛或胎牛血清(也可用商品化的无血清细胞培养液培养)外还需添加细胞因子活性中和抗体和/或细胞增殖抑制性细胞因子和免疫抑制剂和/或抗癌药。这些免疫抑制剂和抗癌药包括普乐可复(FK506)、环孢素系列如环孢霉素A、C、环磷酰胺、硫唑嘌呤、雷帕霉素、RS-61443(mycophenolate mofetil, MM, 分子式为
30 $C_{24}H_{11}NClO_7$)(是霉酚酸(mycophenolic acid, MPA, 分子式为 $C_{17}H_{11}O_6$)的一种酯类衍生

物)、BQR(6-氟-2-3 甲基-4-喹啉酸)、脱氧精脒菌素、人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 JM 分泌的免疫抑制因子、肾上腺皮质激素(如甲基强的松龙、强的松、氢化可的松、地塞米松等)、拓扑酶抑制剂[如喜树碱(CAM)、依托泊甙(VP-16)]、烷化剂[如顺铂、氮芥、美法兰、本丁酸氮芥、卡氮芥等]、抗代谢药[甲氨蝶呤、阿糖胞苷、胸苷酸合成酶抑制剂双氮四氢叶酸等]、维甲酸类化合物-维生素 A 衍生物[如全反式维甲酸、棕榈酸视黄质、4-N-羟基苯维甲氨]及其它一些潜在的具有诱导免疫抑制作用或诱导肿瘤细胞凋亡作用的药物。前面所述各种抗原的作用在于抑制其特异性活化淋巴细胞的活性或诱导其特异性活化淋巴细胞的主动凋亡;细胞因子活性中和抗体和 / 或细胞增殖抑制性细胞因子的作用在于诱导活化淋巴细胞的被动凋亡;后面所述这些免疫抑制药物的作用在于使试验结果稳定、准确、敏感、阴阳性结果对比明显。

培养液中各种免疫抑制剂和抗癌药的使用剂量不尽相同,需根据各药的特点及生产厂家不同调整控制它们的浓度,一般在它们的说明书中最低血药维持浓度(谷值)的上下 1000 倍左右(其剂量范围大致为: 0.001ng-100 μ g / ml),如 FK506 的剂量范围为 0.001ng—10 μ g / ml(最适使用范围 0.01ng-100ng / ml),环孢霉素 A 的剂量范围为 0.01ng—10 μ g / ml(最适使用范围 0.1ng—1 μ g / ml),其使用浓度以该药能达到使检查结果重复性好的最低浓度为其合适浓度。免疫抑制剂或抗癌药的选用,可根据情况选其中的一种单独使用或几种混合应用。

对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体,包括白介素 1、2、4、3、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23,干扰素(- α 、 β 、 γ),粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、神经生长因子(NGF)等所有对淋巴细胞、单核细胞等单个核细胞具有促进活化和增殖作用的细胞因子的中和抗体;一些对淋巴细胞、单核细胞等单个核细胞具有诱导凋亡、抑制活化和抑制增殖作用的细胞因子包括 IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、转化生长因子 β (TGF- β)、干扰素 γ 、肿瘤坏死因子(TNF)、CTLA4、及其他一些细胞因子或细胞因子融合蛋白,如:细胞毒 T 细胞相关抗原 4(CTLA4)与人免疫球蛋白 G(IgG) Fc 段的融合蛋白 CTLA4.Ig 等。

中和抗体这里是指对细胞因子生物学活性具有抑制作用的抗体。其意义在于对一些具有刺激细胞活化增殖作用的细胞因子的生物学活性进行抑制,使其不能发挥生物学作用。

这些中和抗体和抑制性细胞因子的作用在于协助特异性抗原对特异性活化淋巴细胞诱导特异性抑制，即和特异性抗原共同作用可抑制抗原特异性活化淋巴细胞及单核细胞等的细胞活性；由于不同细胞因子在其中的作用不同，不同单位生产的同一细胞因子或细胞因子中和抗体的活性单位或效价不同等原因，其培养液中的中和抗体的终浓度差别也很大，可在 $1\mu\text{g}$ - $10\text{mg}/\text{ml}$ 之间的任一浓度，以使检测结果最敏感、重复性最好时的浓度为其合适的浓度；抑制性细胞因子使用浓度以其活性单位计算，一般终浓度应在 0.01 - 1000 个活性单位/ ml ，(常常在 0.1 - 50 个活性单位/ ml)，以使检测结果达到最敏感、准确时的浓度为其合适浓度。

上述免疫抑制剂、细胞因子活性中和抗体及具有抑制淋巴细胞或单核细胞活性的细胞因子种类均较多，其作用也较复杂，检测时可选择其中的一种或几种搭配使用，其各种组合不受限制，以能使检测敏感、准确、重复性好为标准。

上述通过各种方法得到的目的抗原、无关对照抗原及用淋巴细胞分离液分离的被检测者的单个核细胞，用含合适浓度合理搭配的免疫抑制剂和抗癌药、细胞因子中和抗体或/和抑制性细胞因子的细胞培养液稀释至合适的浓度。

用携带目的抗原的细胞作抗原时，如方法 1、2、3、4 得到的抗原，抗原细胞的浓度约为 0.001 - $10\times 10^6/\text{ml}$ ，被检者单个核细胞浓度约为 0.1 - $5\times 10^6/\text{ml}$ ，优选前者为 1 - $2\times 10^6/\text{ml}$ 左右，后者为 1 - $3\times 10^6/\text{ml}$ 左右。若为可溶性纯化抗原，其特异性目的抗原的浓度(不包括非特异性蛋白)，约为 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ - $10\text{mg}/\text{ml}$ 。方法 5 所得到的抗原的使用浓度，约为 0.1 - 100×10^6 个细胞破碎后的细胞膜稀释至 1ml 使用液，一般为 1 - 100×10^6 个细胞的细胞膜抗原稀释至 1ml 。方法 6、7 所得到的抗原一般以目的抗原计算，使用液配为 $0.1\mu\text{g}$ - $10\text{mg}/\text{ml}$ 。

把上述稀释至合适浓度的目的抗原和无关阴性对照抗原分别与待检的单个核细胞样品，滴入合适的细胞培养板中混合培养，每孔加抗原和待检细胞各 $100\mu\text{l}$ ，放 37°C 的 CO_2 孵箱内培养，在本发明方法所提供的细胞培养环境中，待检样品中的活化淋巴细胞在遇到其特异性抗原时，这些活化淋巴细胞的活性将被明显抑制，在细胞培养 3-72 小时，一般为 20 小时后对试验孔和无关抗原对照孔及不加抗原的单独待检单个核细胞孔的细胞活性进行检测，根据各孔细胞活性的变化，即可判定待检单个核细胞中有无已知抗原对应的活化淋巴细胞。其细胞活性的检测方法有两种，一种是直接法，一种是间接法：前一种是直接给各孔添加某种物质，根据各孔细胞对这种物质的清除能力(阻止该物质如伊红、台盼兰、曙红进入细胞内的能力)或转化能力(如转化可溶性

MTT 为甲臆类结晶的能力)等作为可检测信号来评价各孔细胞的活性;后一种是根据本方法的反应原理,选择合适的检测方法和可检测信号,如细胞活性的降低为细胞凋亡所致,则参考《细胞凋亡的分子医学》(胡野、凌志强、单小云编著,2002年8月军事医学科学出版社出版),就使用细胞凋亡的各种判定方法作为可检测信号,根据凋亡细胞的多少,反推各孔细胞活性的变化。

本发明中的可检测信号是指通过某种方法,或添加某种物质,使试验孔中待检单个核细胞的反应变化结果直观地或通过仪器设备呈现出来的信号,也就是待检单个核细胞的反应变化结果的显示(展示)方式。

本发明的可检测信号主要有以下几种:

10 1、MTT 比色法:给各孔添加 MTT,观察各组细胞转化可溶性 MTT 为甲臆类(formazane)结晶的量,从而了解各组细胞活性增强或减弱等变化的大小。

2、细胞染色法:参考《细胞凋亡的分子医学》(胡野、凌志强、单小云编著,2002年8月军事医学科学出版社出版),根据本发明方法的反应原理,通过苏木素—伊红染色法,甲基绿—派诺宁染色法,姬姆萨染色法,瑞氏染色法对各组细胞进行染色后放
15 显微镜下直接观察,根据凋亡细胞的特征性变化,计数比较各组细胞发生凋亡的比率。

3、荧光抗原染色法:参考《细胞凋亡的分子医学》(胡野、凌志强、单小云编著,2002年8月军事医学科学出版社出版),根据本发明方法的反应原理,通过用丫啶橙(Acridine orange)、碘化丙啶、溴化乙啶、罗丹名 123、异硫氰酸荧光素(标记抗体)等标记各组细胞,根据凋亡细胞的特征性变化,在荧光显微镜下观察各组细胞发生凋亡
20 的多少。

4、酶联免疫吸附试验:参考《细胞凋亡的分子医学》(胡野、凌志强、单小云编著,2002年8月军事医学科学出版社出版),根据本发明方法的反应原理,利用抗组蛋白抗体和抗 DNA 抗体,通过细胞凋亡的酶联免疫分析方法,检测各组细胞由于细胞凋亡所形成的断裂的单链或双联 DNA 的多少,从而推测各组细胞发生凋亡的多少。

25 MTT 方法和细胞凋亡检测方法之间相互的对应关系是:MTT 方法是利用活细胞具有转化可溶性 MTT 为蓝紫色甲臆类(formazane)结晶物质的原理(死细胞不具有这种能力),检测各组细胞中活细胞的活性,活细胞越多、细胞活性越强可溶性 MTT 转化为蓝紫色甲臆类(formazane)结晶物质的量越多;细胞凋亡检测方法检测的是各组细胞的凋亡情况-即死细胞的多少;在试验中各组加入的待检活细胞是一定的,各
30 组中待检细胞发生凋亡的多,则其中的活细胞就少,转化可溶性 MTT 为蓝紫色甲臆

类结晶物质的量就少,反之,则转化可溶性 MTT 为蓝紫色甲臆类结晶物质的量就大。

通过以上分析,虽然本发明方法的试验结果可以通过多种方法和形式,转化成各种可检测信号,但本发明经过比较认为,四唑盐比色是其中最方便和敏感的试验结果显示方法。在细胞培养结束后给各孔加四唑盐(MTT 5mg / ml)10-20 μ l,继续放 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 孵箱内培养 0.5-6h,一般为 1-2h,其结果可以放倒置显微镜下直接观察各孔转化黄色可溶性 MTT 为蓝紫色甲臆类结晶物质的量。也可以在培养结束后除去各孔的培养上清,然后每孔加二甲基亚砷(DMSO)100-150 μ l 轻轻振荡 5 分钟,令甲臆类结晶充分溶解后,用酶标仪在 490nm-590nm 之间选一具有最大吸光值的波长测各孔吸光值,一般用 550nm,比较试验孔与阴性对照孔之间的差异,从而了解待测样品中有无已知目的抗原特异性活化淋巴细胞的存在,本发明的阴性对照孔还包括不加任何抗原的、只含有待检细胞的孔。

本发明的创新性在于建立了一个用已知抗原检测特异性活化淋巴细胞,或用已知特异性活化淋巴细胞检测特异性抗原的方法。其各种抗原的制备和得到的方法不是本发明的内容。无论用什么方法得到的何种形式的抗原均可用于本发明的试验并得到相应的试验结果。用不同的抗原进行检测只表示其检测的活化淋巴细胞的特异性不同。使用不同的抗原对本试验的操作、试验结果的得出和阴阳性判断均无影响。故本发明适用于检测的抗原很多,这里我们只用几个实施例来具体说明本发明的试验操作、目的、意义。本发明的方法被称为活化淋巴细胞特异性试验(activated lymphocyte specificity assay(ALSA)),本发明的对照试验为混合淋巴细胞培养(mixed lymphocyte culture(MLC))(Science 143, 813-814, 1964;Blood, 23(1):108-116, 1964)。

附图说明

图 1. 反应细胞来自未进行过任何器官移植的正常人的 ALSA 试验和 MLC 试验倒置显微镜下直接观察的照片(10x4)。该实验为阴性对照实验(反应细胞中肯定不具有针对任何 HLA 抗原的活化淋巴细胞)左侧两照片为 ALSA 试验的实验组(图 1B)和对照组(图 1C)的实验结果;右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组(图 1A)和对照组(图 1D)的实验结果。

图 2. 活检证实为未发生排斥反应的心脏移植患者的 ALSA 试验和 MLC 试验倒置显微镜下直接观察的照片(10x10)。左侧两照片为 ALSA 试验的实验组(图 2B)和对照组(图 2C)的实验结果;右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组(图 2A)和对照

组（图 2D）的实验结果。

图 3. 活检证实为一级排斥反应的心脏移植患者的 ALSA 试验和 MLC 试验结果的倒置显微镜下所见（照片）10x4。左侧两照片为 ALSA 试验的实验组（图 3B）和对照组（图 3C）的实验结果；右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组（图 3A）和对照组（图 3D）的实验结果。

图 4. 活检证实为三级排斥反应的患者的 ALSA 试验和 MLC 试验结果的倒置显微镜下所见（照片）10x10。左侧两照片为 ALSA 试验的实验组（图 4B）和对照组（图 4C）的实验结果；右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组（图 4A）和对照组（图 4D）的实验结果。

10

具体实施方式

下述实施例是为了更好的解释本发明的目的、意义，而不应被理解限制本发明的范围。

15 实施例 1. 本发明方法的建立

活化淋巴细胞通过单向混合淋巴细胞（MLC）培养方法制备：其反应细胞和刺激细胞分别来自不相关的、健康试验志愿者的外周血，他们的淋巴细胞用商品化淋巴细胞分离液分离其外周血得到。刺激细胞（其细胞膜上表达的 HLA 抗原作为刺激抗原刺激反应细胞活化（细胞活性增强）或凋亡（细胞活性减弱））常规用 25μg/ml 丝列霉素处理、生理盐水洗涤后，一部分用于初次单向混合淋巴细胞培养—制备活化淋巴细胞；另一部分用常规细胞冻存方法，在<-70℃冻存以备用于对初次混合淋巴细胞培养活化的淋巴细胞进行再刺激。

常规初次单向混合淋巴细胞培养 4 天后收获反应细胞作为活化的淋巴细胞，这些活化的淋巴细胞经无血清 1640 培养基洗涤一次后再次作为反应细胞用于本发明及其对照研究中；本发明及其对照研究中的刺激细胞仍用上述冻存的、已在初次单向混合淋巴细胞反应中使用了的细胞。反应细胞和刺激细胞均用含 10%胎牛血清（FCS）的 1640 培养液制备成 2×10^6 个细胞/ml 的细胞悬液；纯化的 IL-2 中和单抗（neutralizational monoclonal antibody, N-mAb）5C9 为 8mg/ml（购自第四军医大学免疫教研室），试验和对照试验均分为试验组和对照组，对照试验实际上为二次 MLC；ALSA 试验就是在二次 MLC 试验系统中添加 15μl N-mAb。

ALSA 试验分组:

B 组、试验组: 反应细胞 100 μ l + 刺激细胞 100 μ l + 15 μ l N-mAb;

C 组、对照组: 反应细胞 100 μ l + 10%FCS 1640 培养液 100 μ l + 15 μ l N-mAb

MLC 试验分组:

5 A 组、试验组: 反应细胞 100 μ l + 刺激细胞 100 μ l ;

D 组、对照组: 反应细胞 100 μ l + 10%FCS 1640 培养液 100 μ l

细胞培养载体为 96 孔圆底细胞培养板, 每组设 3 个复孔, 所有孔均加反应细胞 100 μ l, 两个试验组均另加刺激细胞 100 μ l; 两对照组不加刺激细胞, 作为替代均加 10%FCS 1640 培养基 100 μ l, 。ALSA 试验的两组每孔另加 IL-2 中和单抗 15 μ l。放 37°C
10 CO₂ 孵箱内培养 20 小时, 然后每孔加 MTT 10 μ l, 继续培养 1h, 在倒置显微镜下观察结果或去除各孔培养液, 每孔添加 150 μ l 二甲基亚砷, 使兰紫色结晶物质充分溶解后, 用酶标仪测各孔 550nm 处吸光值。

表 1: 来自完全不同的 6 个个体的三对刺激细胞和反应细胞的三次 ALSA 和 MLC 试验, 细胞培养 20 小时的结果 (MTT 比色法)

试验	ALSA			MLC		
	B 组 试验组	C 组 对照组	抑制率	A 组 试验组	D 组 对照组	抑制率
1	0.339	0.433	-22%	0.744	0.667	+12%
2	0.261	0.470	-44%	0.640	0.540	+19%
3	0.240	0.588	-41%	0.706	0.732	-4%

注:; 试验组和对照组的每一个数字均为三个复孔的平均值; 抑制率显示的是刺激细胞 (HLA 抗原) 对其特异性活化淋巴细胞的抑制程度; ALSA 试验每孔均添加了甲基强的松龙 (甲强) 和 FK506, 其终浓度分别为: 5 μ g/ml 和 0.125ng/ml。MLC 试验未用免疫抑制剂。抑制率=(试验组 OD_{550nm} 三个复孔平均值/对照组 OD_{550nm} 三个复孔平均值) \times 100-1, “-” 表示抑制。“+” 表示增强。下同。
20

无论 ALSA 试验还是 MLC 试验, 试验组均添加有和反应细胞同样数量的刺激细胞, 按现有的免疫学理论 MLC 试验应该是试验组细胞活性明显增强, 至少对 MTT 的处理能力绝对不应低于只含有反应细胞的对照组。而从表 1 可见 MLC 试验结果或增强或

减弱无法得到一个稳定的结果；实际上目前在免疫学领域，用 MLC 检测特异性活化淋巴细胞（即二次混合淋巴细胞培养）的可能性已被否定，即 MLC 方法不适合用于活化淋巴细胞特异性的检测。而 ALSA 试验中试验组的细胞活性与对照组比明显减弱，与 MLC 试验应该出现的结果完全相反，其阳性结果是抑制性表现，既当反应细胞中有对应抗原活化的淋巴细胞存在时，其试验组活化淋巴细胞的活性表现为抑制，与其对照组比其细胞活性明显减弱；且来源于不同个体的细胞的试验结果一致，表明该方法比较稳定。由此说明，在 MLC 试验系统中添加白细胞介素 2 中和单抗后建立起来的 ALSA 试验虽然与 MLC 试验有关，但从其反应系统中添加的成分、反应结果的表现形式、及其结果的意义等方面均与 MLC 不同，表明 ALSA 试验已是一个完全不同于 MLC 试验的一个新的试验方法。其中免疫抑制剂的使用主要是提高试验结果的敏感性、稳定性和可重复性；当排斥反应较强时，不加免疫抑制剂也可得出较好的结果（实施例 2 中的表 4）。

实施例 2. 本发明的方法在诊断移植排斥反应中的应用

1) 刺激细胞（作为检测用 HLA 抗原的细胞）的制备：在心脏移植时，无菌操作取供体脾脏，用 200 目研磨网研磨供者脾细胞，用无血清 1640 培养液(GIBCO 公司)1500rpm 洗涤两次，去上清，沉淀用无血清 1640 培养液制成约 1×10^8 个细胞 / ml 的细胞悬液，用常规人淋巴细胞分离液(GIBCO 公司)分离单个核细胞，2000rpm 水平离心机离心 20 分钟，吸取分离液与 1640 培养液界面上的细胞层细胞移入另一无菌离心管，用无血清 1640 培养液，1500rpm、1000rpm 离心洗涤两次，去上清(若有红细胞则用 37-40℃预温的 0.83% NH_4Cl 溶液悬起，37-40℃水浴处理 10 分钟，然后再用无血清 1640 培养液 1000rpm 离心洗涤 2 次)，沉淀用含丝裂霉素(Sigma 公司)25 μg / ml 的无血清 1640 培养液制成约 1×10^7 个细胞 / ml 的细胞悬液，37℃水浴作用 40 分钟，1000rpm 离心 10 分钟弃上清，沉淀细胞用无血清 1640 培养液 1000rpm 离心洗 3 次，沉淀用细胞冻存液(按《实用单克隆抗体技术》徐志凯主编，陕西科学技术出版社，1992 年第一版中的配方制备)制成约 2×10^7 个细胞 / ml 的细胞悬液，分装入冻存管内，-70℃冰箱或液氮中冻存储用。

2) 纯化白细胞介素-2 中和单抗(第四军医大学免疫学教研室生产)，用无血清 1640 培养液或 PBS 溶液配成 6mg / ml，一次性针头滤器除菌分装，-20℃冻存储用；四氮唑盐(MTT, Sigma 产品)用生理盐水制成 5mg / ml 的使用液，一次性针头滤器过滤除

菌，分装，-20℃冻存备用。

3) 反应细胞(可能含活化淋巴细胞的待检单个核细胞)的制备: 心脏移植 6 个月后(一般在心脏移植 5 天后即可开始定期检测, 也可在怀疑有排斥反应时检测), 分别抽取活检证实未发生排斥反应的受体和活检证实发生了一级和三级排斥反应的受体的静脉血 5-20ml; 另外抽取未进行心脏移植的正常人外周血 10ml。按上述方法分别分离他们的单个核细胞作为可能含有供者抗原特异性活化淋巴细胞的反应细胞; 来自未进行移植的正常人的单个核细胞用作肯定不含有特异性活化淋巴细胞的反应细胞进行阴性对照实验(其实验的刺激细胞为上述任一移植患者的供体细胞); 用无血清 1640 培养液离心洗涤 2 次, 沉淀用含 20% 胎牛血清(GIBCO 公司)的 1640 培养液(其中每 ml 含 FK506 (商品名为普乐可复, 爱尔兰藤泽药品有限公司生产, Fujisawa Ireland Limited)0.125ng, 甲基强的松龙(比利时法玛西亚普强公司生产, Pharmacia & Upjohn) 5μg), 制成约 2×10^6 个细胞 / ml 的细胞悬液备用。在制备反应细胞的同时, 复苏冻存的供者脾细胞, 然后用无血清 1640 培养液 1000rpm 离心洗涤一次, 沉淀用上述含 20% 胎牛血清和免疫抑制剂的 1640 培养液制成 2×10^6 个细胞 / ml 的细胞悬液作为刺激细胞(含供者 HLA 抗原)备用。

4) 分别把供体细胞(刺激细胞)、受体细胞(反应细胞)、IL-2 中和单抗按以下分组及用量加入 96 孔圆底细胞培养板中; A 组: 反应细胞 100μl+刺激细胞 100μl; B 组: 反应细胞 100μl+刺激细胞 100μl+IL-2 中和单抗 15μl; C 组: 反应细胞 100μl+IL-2 中和单抗 15μl+稀释细胞用的 1640 培养液 100μl; D 组: 反应细胞 100μl+稀释细胞用的 1640 培养基 100μl。每组设 3 个复孔。加白细胞介素 2 中和单抗者即 B 组和 C 组分别为 ALSA 试验的试验组和对照组; 不加白细胞介素 2 中和单抗者即 A 组和 D 组分别为 MLC 试验的试验组和对照组。阴性对照实验的刺激细胞为上述任一心脏移植患者的供体细胞, 反应细胞来自未进行心脏移植的正常人外周血单个核细胞。上述操作完成后把培养板放 37℃ 的 CO₂ 孵箱内培养。

5) MTT 显色法显示实验结果: 将上述细胞培养 20h 后每孔加入 MTT 10μl, 继续培养 1h 后可以于倒置显微镜下直接观察各孔黄色水溶性 MTT 转化为蓝紫色甲臞类(formazane)结晶物质的量。也可以进行比色法检测: 先除去各孔培养液, 每孔加 150μl 二甲基亚砷(DMSO), 轻轻震荡 5 分钟, 使甲臞类结晶物质充分溶解后, 用酶标仪测各孔吸光值, 参考波长范围为 550nm

A、倒置显微镜直接观察的结果见图 1、2、3、4 (各图标记 A、B、C、D 与分

组相一致，如 A 就是 A 组）。

图 1 为反应细胞来自未进行过任何器官移植的正常人的 ALSA 试验和 MLC 试验倒置显微镜下直接观察的照片（10x4）。从图 1 可以看出 ALSA 的实验组（图 1B）和对照组（图 1C）结果及 MLC 试验的实验组（图 1A）和对照组（图 1D）的结果均无明显差别，说明反应细胞中没有刺激细胞所携带的 HLA 抗原对应的活化淋巴细胞。但 ALSA 实验的对照组的细胞活性与 MLC 试验的对照组细胞活性比明显减弱，表明白细胞介素 2 中和单抗对细胞活性具有抑制作用。

图 2 为活检证实为未发生排斥反应的心脏移植患者的 ALSA 试验和 MLC 试验倒置显微镜下直接观察的照片（10x10）。ALSA 试验的试验组（图 2B）结果与对照组（图 2C）的结果比无明显减弱，表明反应细胞中无刺激细胞（供体细胞）所携带的 HLA 抗原对应的活化淋巴细胞存在——既受体未发生攻击供体细胞的免疫反应，与活检结果一致。

图 3 为活检证实为一级排斥反应的心脏移植患者的 ALSA 试验和 MLC 试验结果的倒置显微镜下所见（照片）10x4。左侧两照片为 ALSA 试验的实验组（图 3B）和对照组（图 3C）的实验结果；右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组（图 3A）和对照组（图 3D）的实验结果。ALSA 试验的试验组细胞活性与其对照比明显减弱，说明反应细胞（受体细胞）中有刺激细胞（供体细胞）所携带的 HLA 抗原对应的活化淋巴细胞存在——既受体已经启动了攻击供体细胞的免疫反应，与活检结果一致。MLC 试验的实验组和对照组细胞活性却无明显差别，表明 MLC 试验不适合用于器官移植排斥反应的诊断。

图 4. 活检证实为三级排斥反应的患者的 ALSA 试验和 MLC 试验结果的倒置显微镜下所见（照片）10x10。左侧两照片为 ALSA 试验的实验组（图 4B）和对照组（图 4C）的实验结果；右侧两照片是对照实验 MLC 试验的实验组（图 4A）和对照组（图 4D）的实验结果。由图可以看出，ALSA 试验的实验组细胞活性完全被抑制（图 4B），而其对照组（图 4C）的细胞活性仍然较强，表明反应细胞（受体细胞）中有刺激细胞（供体细胞）所携带的 HLA 抗原对应的活化淋巴细胞存在——既受体已经启动了攻击供体细胞的免疫反应。其 MLC 试验的实验组细胞活性与其对照组比也明显减弱（图 4A），这一现象可能表明反应细胞中针对其供体抗原的活化淋巴细胞较多；因为一级排斥反应时（见图 3）较少出现这一现象。

由以上结果可见，当发生排斥反应时，ALSA 的实验组细胞活性与其对照组比明

显减弱(图 3B、C, 图 4B、C), 图 3B、图 4B 几乎未产生甲臆类结晶物质, 说明受体的单个核细胞中存在已被供体细胞表达的 HLA 抗原活化的淋巴细胞——既受体已启动了针对供体 HLA 抗原的免疫反应, 活检分别证实患者发生了一级和三级排斥反应。而 MLC 的实验组和对照组结果或无差别(图 3A、图 3D)或有差别(图 4A、图 4D), 结果波动较大, 说明该方法不能用于活化淋巴细胞检测和器官移植排斥反应的诊断。

当无排斥反应发生时, ALSA 试验的实验组和对照组的细胞活性与 MLC 试验的实验组和对照组比或有减弱(图 1B、1C), 但 ALSA 的实验组和对照组之间的细胞活性均无明显差别(图 1B、1C, 图 2B、2C)

10 B、比色法检测: ALSA 试验的结果不但可在倒置显微镜下直接观察, 也可先除去各孔培养液, 每孔加 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO), 轻轻震荡 5 分钟, 使甲臆类结晶物质充分溶解后, 用酶标仪测各孔吸光值, 参考波长范围为 550nm。

抽取活检证实发生一级排斥反应的受体静脉血制备待检淋巴细胞, 重复上述步骤 1)~4), 改变其中刺激细胞浓度, 用比色法测得的实验结果如表 2。

15 表 2. 反应细胞来自活检证实发生了一级排斥反应的心脏移植受者的外周血, 冻存的其供者的脾细胞作刺激细胞, 观察不同刺激细胞浓度对 ALSA 试验和 MLC 试验的影响

刺激细胞 浓度 (/ml)	ALSA			MLC		
	B 组 试验组	C 组 对照组	抑制率	A 组 试验组	D 组 对照组	抑制率
10 ⁶	0.135	0.223	-39%	0.389	0.304	+28%
10 ⁵	0.266	0.276	-4%	0.296	0.309	-4%
10 ⁴	0.221	0.266	-17%	0.426	0.385	+11%
10 ³	0.266	0.29	-8%	0.450	0.361	+25%
10 ²	0.273	0.383	-29%	0.517	0.418	+24%
10 ¹	0.355	0.275	+29%	0.456	0.400	+14%
10 ⁰	0.315	0.249	+27%	0.396	0.361	+10%

注: 同表 1

20 表 2 的结果显示, ALSA 试验的实验组细胞活性与对照组比明显减弱, 表明其反应细胞中存在供体 HLA 抗原活化的淋巴细胞, 既受者已经启动了攻击供体器官的免

疫反应，这与活检的结果一致。ALSA 试验的刺激细胞浓度，可以在 10^6 – 10^2 /ml 之间——既刺激细胞浓度在这个范围时均可用于检测反应细胞中是否存在抗原对应的活化淋巴细胞；刺激细胞少于 10^2 /ml 就不能检测出反应细胞中是否存在抗原对应的活化淋巴细胞，既不能用于排斥反应诊断；也就是说，在进行活化淋巴细胞检测时，检测用抗原应达到一定的浓度，过少就会出现假阴性（表 2，刺激细胞浓度在 10^1 /ml 和 10^0 /ml 时结果与活检结果不一致），不能得出正确的实验结果。从表 2 还可以看出，当刺激细胞浓度分别为 10^6 个细胞/ml 和 10^2 个细胞/ml 时抑制作用最强，分别为 -39% 和 -29%，这似乎进一步证实了文献（Annu.Rev.Immunol.1999,17:221-3）关于抗原过多或过少有利于诱导特异性活化淋巴细胞主动凋亡的结论。

10

抽取活检证实发生一级排斥反应的受体静脉血制备待检淋巴细胞，重复上述步骤 1)–4)，在细胞培养的不同时间观察试验结果，用比色法测得的结果如表 3。

表 3. 反应细胞来自活检证实发生了一级排斥反应的心脏移植患者的外周血，冻存的其供者的脾细胞作刺激细胞，采用不同细胞培养时间进行的 ALSA 和 MLC 试验的动态观察结果

15

细胞培养 时间 (h)	ALSA			MLC		
	B 组 试验组	C 组 对照组	抑制率	A 组 试验组	D 组 对照组	抑制率
1	0.137	0.124	+10%	0.310	0.192	+61%
2	0.071	0.09	-21%	0.153	0.109	+40%
3	0.113	0.114	-1%	0.240	0.160	+50%
4	0.039	0.062	-37%	0.150	0.162	-7%
5	0.058	0.156	-63%	0.270	0.232	+16%
6	0.029	0.082	-65%	0.400	0.181	+121%
7	0.039	0.151	-74%	0.259	0.269	-4%
9	0.032	0.033	-3%	0.225	0.207	+9%
11	0.027	0.054	-50%	0.169	0.248	-32%
13	0.042	0.068	-38%	0.230	0.350	-34%
15	0.11	0.164	-33%	0.265	0.200	+32%
17	0.073	0.09	-19%	0.133	0.183	-27%

20	0.09	0.137	-34%	0.162	0.203	-20%
----	------	-------	------	-------	-------	------

注：同表 1

表 3 动态观察的结果显示，ALSA 试验的实验组细胞活性与其对照组比在细胞培养 2 小时后即明显减弱，表明其反应细胞中存在供体 HLA 抗原活化的淋巴细胞（以上已反复说明 ALSA 实验组的细胞活性明显低于其对照组时，表明反应细胞中存在对刺激细胞所携带的抗原特异的活化淋巴细胞），既受者已经启动了攻击供体器官的免疫反应，这与活检的结果一致；其最大抑制作用发生在细胞培养 7 小时时，其抑制率达到 74%。该结果同时说明，ALSA 实验方法用于临床检测在 2 小时以后即可稳定得出与活检结果一致的试验结果，显示了其快速检测的特点。表 3 中 MLC 的实验结果时而增强时而减弱，无法得出一个稳定的实验结果，进一步说明其不能用于对活化淋巴细胞的检测。

重复上述步骤 1)-4) 对发生不同排斥反应的个体进行检测，并如上所述进行比色法检测，结果见表 4。其中标记“*”组的 ALSA 试验和 MLC 试验均未使用免疫抑制剂，其结果的观察时间为细胞培养 72 小时后加 MTT 显示结果。

表 4. ALSA 与活检排斥反应分级对照结果

活检分级	ALSA			MLC		
	B 组 试验组	C 组 对照组	抑制率	A 组 试验组	D 组 对照组	抑制率
3 级	0.02*	0.098*	-80%	0.118*	0.122*	-3%
1 级	0.09	0.137	-34%	0.162	0.203	-20%
1 级	0.135	0.223	-39%	0.389	0.304	+28%
0 级	0.263	0.287	-8%	0.374	0.328	+14%

从表 4 的结果可以看出，ALSA 试验方法在临床上诊断排斥反应方面与活检的方法对照有很好的一致性，其活检排斥反应的级别与本发明方法的结果（抑制率）似乎也有一定的关系——既排斥反应越强，抑制率越高。

通过用本方法对 15 例心脏移植患者进行跟踪监测 100 余人次，活检对照 56 例次，本试验检测结果阳性 29 例次，其中活检证实 18 例次无症状排斥反应，其中 4 例次为

III 级排斥反应, 5 例次为 II 级排斥反应, 9 例次为 I 级排斥反应。另有 11 例次活检结果虽不正常但达不到 I 级排斥反应诊断标准。27 例次本试验结果阴性者活检均为阴性。详见表 5。

表 5、ALSA 试验与临床活检结果一致性对照表

检测方法		活 检	
ALSA 试验		阳性	阴性
	阳性	18	11
	阴性	0	27

5 两种试验结果之间的一致性为 80.3%，特异性为 71%，敏感性 100%。

从表 1、2、3、4 和图 1、2、3、4 的结果可以看出，ALSA 方法得出的结果非常客观、明确、无争议，而且简便、快速、便于标准化。

10 上面已经提到，排斥反应的发生首先开始于淋巴细胞的活化，活化淋巴细胞的出现应早于病理改变。本方法主要侧重于检测患者外周血中有无供体抗原特异性的活化淋巴细胞，所以本试验的结果可能早于活检病理改变，这可能就是所谓的假阳性产生的原因。就上表中 11 例假阳性结果的活检片子看虽达不到 I 级排斥反应的诊断标准，但也不是完全正常，这可能是由于活检本身反映情况不全面的原因所致。也就是说本发明特异性较低的主要原因是因为其敏感性高。

15 测试结果说明：对每个心脏移植患者进行动态监测，其监测结果与活检病理结果进行对照。

真阳性(TP)：本方法为阳性，活检证实发生了 I 级以上排斥反应。

真阴性(TN)：本方法为阴性，活检证实无排斥反应发生。

假阳性(FP)：本方法为阳性，活检证实无排斥反应发生。

假阴性(FN)：本方法为阴性，活检证实发生了 I 级以上排斥反应。

20 一致性 = $(TP+TN) / (TP+TN+FP+FN)$

特异性 = $TN / (TN+FP)$

敏感性 = $TP / (TP+FN)$

25 采用上述步骤，根据 100 多次 ALSA 试验、MLC 试验结果，和数十次与活检结果对照，我们总结出本试验用于排斥反应诊断的结果判定标准：

一、倒置显微镜下直接观察

有排斥反应发生时	A (MLC 实验组)、B (ALSA 实验组) 两组与 C (ALSA 对照组)、D (MLC 对照组) 两组相比, 细胞活性明显减弱, 尤其是 B 组, 细胞活性可完全被抑制, A 组细胞活性减弱的程度可能与排斥反应强弱有关, 排斥反应越强减弱越明显, 排斥反应弱时, A 组与 C、D 组比活性减弱不明显; 但只要有排斥反应, B 组细胞活性就会比 C 组及 A 组、D 组明显减弱。
无排斥反应	各组细胞活性无明显差别或 B、C 组均较弱, 有时 C 更弱。
无排斥反应但最近或目前正在发生细菌或病毒感染	各组细胞活性均较强, 各组之间亦无明显差别, 或 B、C 组稍减弱。
最近或目前正在发生细菌或病毒感染, 同时有排斥反应发生	A 组细胞活性或有减弱, B 组的细胞活性比 C 组及 A、D 组的细胞活性明显减弱。D 组的细胞活性很强, 或 A、C、D 组细胞活性均很强。

二、酶标仪测各孔吸光值

细胞培养 2 小时后加 MTT, 每孔 10 μ l, 继续培养 0.5-1.5 小时后吸去每孔的培养液, 每孔加 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO), 轻轻震荡 5 分钟, 使甲臌类 (formazane) 结晶物质充分溶解后, 用酶标仪测各孔吸光值, 参考波长为 550nm, 以只加 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO)的无细胞孔为调零孔。以抑制率判断, 大于-10%为阳性, 等于-1~-10%为可疑阳性。

10 实施例 3. 乙脑病毒感染患者的诊断:

乙脑病毒特异性刺激抗原的制备: 参考文献 (第四军医大学学报 1984 年第 5 卷第四期 251-254; Journal of Medical Colleges of PLA 1986,1(4):356-362) 制备纯化的乙脑病毒, 加 10%甲醛溶液固定 4 $^{\circ}$ C 过夜 (约 12 小时), 离心浓缩、生理盐水洗涤 4 次, 紫外分光光度计测蛋白含量, 分装入冻存管内冻干, -70 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存备用。

15 纯化白细胞介素-2 中和单抗及四氮唑盐(MTT)的制备如实施例 2。

待检单个核细胞的制备: 抽取高热期已确诊的乙脑患者静脉血 5-10ml, 按实施

例 2 的方法分离单个核细胞, 用无血清 1640 培养液洗涤 2 次, 沉淀用含 20% 胎牛血清的 1640 培养液(其中每 ml 含 FK506 0.125ng, 甲基强的松龙 5 μ g), 制成药 2 $\times 10^6$ 个细胞 / ml 的细胞悬液备用。在制备待检单个核细胞的同时, 取出冻存的乙脑病毒, 用含 20% 胎牛血清的 1640 培养液(其中每 ml 含 FK506 0.125ng, 甲基强的松龙 5 μ g) 制成约 3mg / ml 病毒蛋白的病毒悬液备用。

分别把患者待检单个核细胞悬液、病毒悬液、IL-2 中和单抗按以下分组及用量加入 96 孔圆底细胞培养板中; 实验组: 患者待检细胞 100 μ l+病毒悬液 100 μ l+IL-2 中和单抗 35 μ l; 对照组: 患者待检细胞 100 μ l+IL-2 中和单抗 35 μ l+稀释细胞用的 1640 培养液 100 μ l。每组设 3 个复孔。上述操作完成后把培养板放 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 孵箱内培养。

10 MTT 显色法: 在上述细胞培养 7h 后加入 MTT 每孔 5 μ l, 继续培养 1h 后除去各孔培养液, 每孔加 100 μ l 二甲基亚砷(DMSO), 轻轻震荡 5 分钟, 使甲臯类结晶物质充分溶解后, 同上用酶标仪测各孔吸光值, 结果见表 6。

表 6: 已确诊的乙脑高热期患者用 ALSA 方法的检测结果

病例	ALSA 试验		
	试验组	对照组	抑制率
1	0.167	0.469	-64%
2	0.254	0.482	-47%

15 注: 试验组和对照组的每一个数字均为三个复孔的平均值; 抑制率显示的是乙脑病毒抗原对其特异性活化淋巴细胞的抑制程度; ALSA 试验每孔均添加了甲强和 FK506, 其终浓度分别为: 5 μ g/ml 和 0.125ng/ml。

从表中可以看出, 其乙脑病毒抗原对待检单个核细胞的抑制作用分别达到 64% 和 47%, 表明其反应细胞中有大量乙脑病毒抗原对应的活化淋巴细胞——即最近患者被
20 乙脑病毒感染过或接种过乙脑疫苗。

权利要求

1. 一种检测机体活化淋巴细胞特异性的方法，此方法包括：

5 1) 用培养基稀释检测用抗原，所述抗原能使机体的淋巴细胞活化；所述培养基除包含常规细胞培养所需成分外，还添加了对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体和 / 或对单个核细胞具有诱导凋亡或抑制活化或抑制增殖作用的细胞因子；

2) 用所述培养基制备包含待检活化淋巴细胞的单个核细胞样品；

10 3) 将所述检测用抗原、含待检活化淋巴细胞的单个核细胞样品加入细胞培养板中一起培养；

4) 通过比较试验孔与阴性对照孔的可检测信号的差异，来确定样品中是否存在所述抗原特异的活化淋巴细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述抗原选自人主要组织相容性抗原，同种异体抗原，异种抗原，病毒抗原或细菌抗原。

15 3. 权利要求 2 的方法，其中所述抗原是颗粒抗原或可溶性抗原；其中所述人主要组织相容性抗原是 HLA I 类抗原或 II 类抗原中的一种，或是多种 HLA I 类和 II 类抗原的混合物。

4. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述培养基还添加了免疫抑制剂和 / 或抗肿瘤药，基于所述培养基的量，所述免疫抑制剂或抗肿瘤药的用量为 0.001ng-100μg / ml，所述对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体的用量为 1μg-10mg / ml，所述对单个核细胞具有诱导凋亡或抑制活化或抑制增殖作用的细胞因子的用量为 0.01-1000 个活性单位 / ml。

5. 权利要求 1 的方法，其特征在于，所述可检测信号是指能反映各孔细胞活性变化的信号。

25 6. 权利要求 4 的方法，其中所述免疫抑制剂选自普乐可复，环孢素，环磷酰胺，硫唑嘌呤，雷帕霉素，RS-61443，BQR，人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 JM 分泌的免疫抑制因子，脱氧精脒菌素或肾上腺皮质激素；所述抗肿瘤药选自拓扑酶抑制剂、烷化剂，抗代谢药，维甲类化合物-维生素 A 衍生物或潜在的具有诱导免疫抑制作用或诱导肿瘤细胞凋亡作用的药物。

30 7. 权利要求 6 的方法，其特征在于，所述免疫抑制剂和抗癌药单独使用或联合

使用。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述肾上腺皮质激素选自甲基强的松龙，强的松，氢化可的松或地塞米松。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述环孢素选自环孢霉素 A 或环孢霉素 C。

5 10. 权利要求 4 的方法，其中所述对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子选自白细胞介素 1、2、3、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23， α -干扰素， β -干扰素， ω -干扰素， γ -干扰素，粒细胞集落刺激因子，巨噬细胞集落刺激因子，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子，干细胞因子或血小板生成素。

10 11. 权利要求 4 的方法，其中所述对单个核细胞具有抑制活化和抑制增殖作用的细胞因子选自白细胞介素 2、4、10、15 或转化生长因子 β 。

12. 一种用于检测活化淋巴细胞特异性的培养基，其特征在于，除包含常规细胞培养所需成分外，还添加了免疫抑制剂和 / 或抗癌药和对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体和 / 或对单个核细胞具有抑制活化和抑制增殖作用的细胞因子。

15 13. 权利要求 12 的培养基，其特征在于，基于所述培养基的量，所述免疫抑制剂的用量为 0.001ng—100 μ g / ml。

14. 权利要求 12 的培养基，其特征在于，基于所述培养基的量，所述对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子的中和抗体的用量为 1 μ g-10mg / ml。

15. 权利要求 12 的培养基，其特征在于，基于所述培养基的量，所述对单个核细胞具有抑制活化和抑制增殖作用的细胞因子的用量为 0.01-1000 个活性单位 / ml。

20 16. 权利要求 14 的培养基，其特征在于所述的细胞因子中和抗体单独使用或联合使用。

17. 权利要求 14 或 15 的培养基，其中所述细胞因子中和抗体和对单个核细胞具有抑制活化和抑制增殖作用的细胞因子可分别使用或联合使用。

25 18. 权利要求 13 的培养基，其中所述免疫抑制剂选自普乐可复，环孢素，环磷酰胺，硫唑嘌呤，雷帕霉素，RS-61443，BQR，脱氧精肌菌素或肾上腺皮质激素；所述抗肿瘤药选自拓扑酶抑制剂、烷化剂，抗代谢药，维甲类化合物-维生素 A 衍生物或潜在的具有诱导免疫抑制作用或诱导肿瘤细胞凋亡作用的药物。

19. 权利要求 18 的培养基，其中所述免疫抑制剂和抗肿瘤药单独使用，或联合使用。

30 20. 权利要求 18 的培养基，其中所述肾上腺皮质激素选自甲基强的松龙，强的

松，氢化可的松或地塞米松。

21. 权利要求 18 的培养基，其中所述环孢素选自环孢霉素 A 或环孢霉素 C。

22. 权利要求 14 的培养基，其中所述对细胞增殖具有刺激活性的细胞因子选自
5 白细胞介素 1、2、3、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
21、22、23， α -干扰素， β -干扰素， ω -干扰素， γ -干扰素，粒细胞集落刺激因子，巨
噬细胞集落刺激因子，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子，干细胞因子或血小板生成素。

23. 权利要求 15 的培养基，其中所述对单个核细胞具有抑制活化和抑制增殖作
用的细胞因子选自白细胞介素 2、4、10、15，转化生长因子 β 或肿瘤坏死因子。